

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

06.4 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 1 月 7 日
Date of Application:

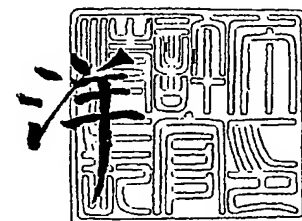
出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 0 2 1 9 2
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 0 0 2 1 9 2]

出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人科学技術振興機構
 独立行政法人産業技術総合研究所

2 0 0 5 年 2 月 2 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 A181P97
【提出日】 平成16年 1月 7日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/09
A01H 1/00
A01H 5/00

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所
つくばセンター内
【氏名】 高木 優

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所
つくばセンター内
【氏名】 平津 圭一郎

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市松代5-5-4 メルヴェーユ松代C-102
【氏名】 光田 展隆

【特許出願人】
【持分】 10/100
【識別番号】 503360115
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構

【特許出願人】
【持分】 90/100
【識別番号】 301021533
【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【代理人】
【識別番号】 100080034
【弁理士】
【氏名又は名称】 原 謙三
【電話番号】 06-6351-4384

【持分の割合】 10/100
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 003229
【納付金額】 2,100円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0316432

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を植物体で生産させ、花器形成に関与する遺伝子の発現を抑制することを特徴とする植物の雄性不稔体の生産方法。

【請求項 2】

上記植物の雄性不稔体は、少なくとも雄ずいの形成が阻害されていることを特徴とする、請求項 1 に記載の植物の雄性不稔体の生産方法。

【請求項 3】

上記転写因子をコードする遺伝子と上記機能性ペプチドをコードするポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含んでいることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の植物の雄性不稔体の生産方法。

【請求項 4】

さらに、上記組換え発現ベクターを構築する発現ベクター構築工程を含んでいることを特徴とする請求項 1 ～ 3 に記載の植物の雄性不稔体の生産方法。

【請求項 5】

上記転写因子が、以下の (a) 又は (b) に記載のタンパク質であることを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の植物の雄性不稔体の生産方法。

(a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、1 個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する機能を有するタンパク質。

【請求項 6】

上記転写因子をコードする遺伝子として、以下の (c) 又は (d) に記載の遺伝子が用いられることを特徴とする請求項 3 または 4 に記載の植物の雄性不稔体の生産方法。

(c) 配列番号 2 に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する遺伝子。

(d) 配列番号 2 に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、且つ、花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する転写因子をコードする遺伝子。

【請求項 7】

上記機能性ペプチドが、次に示す式 (1) ～ (4)

(1) X1-Leu-Asp-Leu-X2-Leu-X3

(但し、式中、X1 は 0 ～ 10 個のアミノ酸残基を示し、X2 は Asn 又は Glu を示し、X3 は少なくとも 6 個のアミノ酸残基を示す。)

(2) Y1-Phe-Asp-Leu-Asn-Y2-Y3

(但し、式中、Y1 は 0 ～ 10 個のアミノ酸残基を示し、Y2 は Phe 又は Ile を示し、Y3 は少なくとも 6 個のアミノ酸残基を示す。)

(3) Z1-Asp-Leu-Z2-Leu-Arg-Leu-Z3

(但し、式中、Z1 は Leu、Asp-Leu 又は Leu-Asp-Leu を示し、Z2 は Glu、Gln 又は Asp を示し、Z3 は 0 ～ 10 個のアミノ酸残基を示す。)

(4) Asp-Leu-Z4-Leu-Arg-Leu

(但し、式中、Z4 は Glu、Gln 又は Asp を示す。)

のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するものであることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の植物体の生産方法。

【請求項 8】

上記機能性ペプチドが、配列番号 3 ～ 19 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するペプチドであることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の植物の雄性不稔体の生産方法。

【請求項 9】

上記機能性ペプチドが、以下の (e) 又は (f) 記載のペプチドであることを特徴とする請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の植物の雄性不稔体の生産方法。

(e) 配列番号 20 又は 21 に示されるアミノ酸配列を有するペプチド。

(f) 配列番号 20 又は 21 に示されるアミノ酸配列において、1 個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチド。

【請求項 10】

上記機能性ペプチドが、次に示す式 (5)

(5) $\alpha 1$ -Leu- $\beta 1$ -Leu- $\gamma 1$ -Leu

(但し、式中 $\alpha 1$ は、Asp、Asn、Glu、Gln、Thr 又は Ser を示し、 $\beta 1$ は、Asp、Gln、Asn、Arg、Glu、Thr、Ser 又は His を示し、 $\gamma 1$ は、Arg、Gln、Asn、Thr、Ser、His、Lys、又は Asp を示す。)

で表されるアミノ酸配列を有するものであることを特徴とする請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の植物の雄性不稔体の生産方法。

【請求項 11】

上記機能性ペプチドが、次に示す式 (6)～(8)

(6) $\alpha 1$ -Leu- $\beta 1$ -Leu- $\gamma 2$ -Leu

(7) $\alpha 1$ -Leu- $\beta 2$ -Leu-Arg-Leu

(8) $\alpha 2$ -Leu- $\beta 1$ -Leu-Arg-Leu

(但し、各式中 $\alpha 1$ は、Asp、Asn、Glu、Gln、Thr 又は Ser を示し、 $\alpha 2$ は、Asn、Glu、Gln、Thr 又は Ser を示し、 $\beta 1$ は、Asp、Gln、Asn、Arg、Glu、Thr、Ser 又は His を示し、 $\beta 2$ は Asn、Arg、Thr、Ser 又は His を示し、 $\gamma 2$ は Gln、Asn、Thr、Ser、His、Lys、又は Asp を示す。)

のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するものであることを特徴とする請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の植物の雄性不稔体の生産方法。

【請求項 12】

上記機能性ペプチドが、配列番号 22～37、133～136 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するペプチドであることを特徴とする請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の植物の雄性不稔体の生産方法。

【請求項 13】

上記機能性ペプチドが、配列番号 38 又は 39 に示されるアミノ酸配列を有するペプチドであることを特徴とする請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の植物の雄性不稔体の生産方法。

【請求項 14】

請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の生産方法により生産された、植物の雄性不稔体。

【請求項 15】

植物体には、成育した植物個体、植物細胞、植物組織、カルス、種子の少なくとも何れかが含まれることを特徴とする請求項 14 に記載の植物の雄性不稔体。

【請求項 16】

請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の生産方法を行うためのキットであって、

花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する転写因子をコードする遺伝子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドをコードするポリヌクレオチドと、プロモーターとを含む組換え発現ベクターを少なくとも含むことを特徴とする植物の雄性不稔体生産キット。

【請求項 17】

さらに、上記組換え発現ベクターを植物細胞に導入するための試薬群を含むことを特徴とする請求項 16 に記載の植物の雄性不稔体生産キット。

【書類名】明細書

【発明の名称】植物の雄性不稔体の生産方法およびこれを用いて得られる植物体、並びにその利用

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物の雄性不稔体を生産する技術に関し、より詳細には、花器形成に関与する遺伝子の転写を抑制することにより、植物の雄性不稔体を生産する生産方法およびこれを用いて得られる植物体、ならびにその利用に関するものである。

【背景技術】

【0002】

異なる品種間で交配させ、雑種を作ると、両親より優れた形質が子供に現れる。これを雑種強勢という。この雑種強勢を利用した交配により、農産物をハイブリッド化して優良品種を作出することが、現在、一般的になっている。例えば、主要な野菜や穀物の優良品種のほとんどは、こうした交配により品種改良されている。

【0003】

雑種強勢の利益を受けるためには、互いに異なった品種間で交配させる必要がある。このため、交配を行う品種において、自家受粉が行われなくする必要がある。ここで、トウモロコシなどの、雄花と雌花が離れた植物では、雄花を人為的に刈り取ることにより、自家受粉を避けることができる。しかし、この作業は、多大な人的労力を有し非常に手間となる。また、イネに代表される自殖性植物では、多数の花が集合していたり、雌しべと雄しべが花弁を包み込んでいたりする。そのため、人為的に雄花を刈り取ることすら困難であり、自家受粉を避けることは非常に難しい。

【0004】

したがって、雑種強勢を利用した交配を行うためには、正常な花粉形成ができない、いわゆる雄性不稔体を利用することが望ましい。事実、これまで、トマトやキュウリなどの多くの植物において、雄性不稔体が得られ、品種改良に利用されてきた。

【0005】

しかし、一方、雄性不稔体が確立されていない植物品種もまた、多数、存在することも事実である。これらの植物において、雄性不稔体を、突然変異によって新たに得る場合、成果を偶然性に委ねざるをえないため、長期にわたる交配が必要となる。したがって、労力もコストも多大に必要となり、現在の農業において、その取り組みは現実的に困難である。

【0006】

そこで、遺伝子組み換え技術を利用して、人為的に雄性不稔体を確立する試みが、これまでいくつか為されている。

非特許文献1には、核内遺伝子による雄性不稔を人為的に引き起こす技術が開示されている。この技術では、ペニチアにカルコンシンターゼのアンチセンス遺伝子を導入して、カルコンシンターゼの活性を抑制する。これにより、フラボノイドの生合成的前駆体であるカルコンの生合成が抑えられ、形質転換されたペニチアは雄性不稔体となる。

【0007】

非特許文献2には、毒性物質によりタバコの葯を消失させることで、雄性不稔体を作成する技術が開示されている。この技術では、N-アセチル-L-オルニチンデアセチラーゼを転写・翻訳産物とする、argE遺伝子を、タバコ組織において特異的に機能するTA29プロモーターに類似するDNA配列に融合させた形で、タバコに導入する。次に、このタバコに、毒性のないN-アセチル-L-フォスフィノスリシンを投与する。すると、葯において発現されたN-アセチル-L-オルニチンデアセチラーゼによって、N-アセチル-L-フォスフィノスリシンが脱アセチル化され、毒性のある、L-フォスフィノスリシンとなる。この毒性物質によって、葯がネクロシスを起こして消失するため、形質転換されたタバコは、花粉が形成されない雄性不稔体となる。

【0008】

また、非特許文献3には、細胞質雄性不稔を人為的に引き起こす技術が開示されている。この技術では、コムギ由来の、RNAエディティングが行われないミトコンドリアatp9遺伝子を、タバコ細胞に導入する。これにより、不活性のATP9タンパク質が発現されて、ミトコンドリアに移行する。その結果、ミトコンドリアの機能が阻害されるため、形質転換されたタバコは雄性不稔体となる。

【0009】

さらに、非特許文献4には、RNAエディティングが行われないミトコンドリアatp9遺伝子のアンチセンス遺伝子を導入した別の形質転換タバコを作成し、これと、RNAエディティングが行われないミトコンドリアatp9遺伝子を導入した形質転換タバコとを交配することによって、次世代で稔性が回復する形質転換タバコを作出する技術が開示されている。

【0010】

ここで、本発明者は、任意の転写因子を転写抑制因子に転換するペプチドを種々見出している（例えば、特許文献1～7、非特許文献5、6参照）。このペプチドは、Class II ERF (Ethylene Responsive Element Binding Factor) タンパク質や植物のジンクフィンガータンパク質 (Zinc Finger Protein、例えばシロイヌナズナSUPERMANタンパク質等) から切り出されたもので、極めて単純な構造を有している。

【特許文献1】特開2001-269177公報（平成13年（2001）10月2日公開）

【特許文献2】特開2001-269178公報（平成13年（2001）10月2日公開）

【特許文献3】特開2001-292776公報（平成13年（2001）10月2日公開）

【特許文献4】特開2001-292777公報（平成13年（2001）10月23日公開）

【特許文献5】特開2001-269176公報（平成13年（2001）10月2日公開）

【特許文献6】特開2001-269179公報（平成13年（2001）10月2日公開）

【特許文献7】国際公開第WO03/055903号パンフレット（平成15年（2003）7月10日公開）

【非特許文献1】Ingrid M. van der Meer, Maike E. Stam, Arjen J. van Tunen, Joseph N. M. Mol, and Antoine R. Stuitje. The Plant Cell, Vol 4, pp 253-262, March, 1992

【非特許文献2】G. Kriete, K. Niehaus, A.M. Perlick, A. Puehler and I. Broer, The Plant Journal, Vol 9, pp 809-818, 1996

【非特許文献3】Michel Hernould, Sony Suharsono, Simon Litvak, Alejandro Araya, and Armand Mouras., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 90, pp. 2370-2374, March, 1993

【非特許文献4】Eduardo Zabaleta, Armand Mouras, Michel Hernould, Suharsono, and Alejandro Araya., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 93, pp 11259-11263, October, 1996

【非特許文献5】Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H. and Ohme-Takagi, M., The Plant Cell, Vol. 13, 1959-1968, August, 2001

【非特許文献6】Hiratsu, K., Ohta, M., Matsui, K., Ohme-Takagi, M., FEBS Letters 514(2002)351-354

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0011】**

しかし、従来、花器形成に関与する遺伝子の転写を抑制することによって、植物の雄性

不稔体を生産する技術は知られていない。

【0012】

本発明は、花器形成に関与する遺伝子の転写を抑制することによって、植物の雄性不稔体を生産する、植物の雄性不稔体の生産方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本願発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、花器形成に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子の1つであるA P E T A L 3タンパク質を転写抑制因子に転換することによって、花卉および雄ずいが形成されない雄性不稔植物体を生産できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0014】

すなわち、本発明にかかる植物の雄性不稔体の生産方法は、上記課題を解決すべく、花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を植物体で生産させ、花器形成に関与する遺伝子の発現を抑制することの特徴としている。上記生産方法では、植物の雄性不稔体は、少なくとも雄ずいの形成が阻害されたものであることが好ましい。

【0015】

また、上記生産方法は、上記転写因子をコードする遺伝子と上記機能性ペプチドをコードするポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含んでいてもよい。

【0016】

また、上記生産方法は、さらに、上記組換え発現ベクターを構築する発現ベクター構築工程を含んでいてもよい。

【0017】

上記転写因子は、以下の(a)又は(b)記載のタンパク質であることを特徴としている。(a)配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。(b)配列番号1に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する機能を有するタンパク質。

【0018】

また、上記転写因子をコードする遺伝子として、以下の(c)又は(d)記載の遺伝子が用いられることが好ましい。(c)配列番号2に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する遺伝子。(d)配列番号2に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、且つ、花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する転写因子をコードする遺伝子。

【0019】

上記機能性ペプチドは、次に示す式(1)～(4)

(1) X1-Leu-Asp-Leu-X2-Leu-X3

(但し、式中、X1は0～10個のアミノ酸残基を示し、X2はAsn又はGluを示し、X3は少なくとも6個のアミノ酸残基を示す。)

(2) Y1-Phe-Asp-Leu-Asn-Y2-Y3

(但し、式中、Y1は0～10個のアミノ酸残基を示し、Y2はPhe又はIleを示し、Y3は少なくとも6個のアミノ酸残基を示す。)

(3) Z1-Asp-Leu-Z2-Leu-Arg-Leu-Z3

(但し、式中、Z1はLeu、Asp-Leu又はLeu-Asp-Leuを示し、Z2はGlu、Gln又はAspを示し、Z3は0～10個のアミノ酸残基を示す。)

(4) Asp-Leu-Z4-Leu-Arg-Leu

(但し、式中、Z4はGlu、Gln又はAspを示す。)

のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するものであることが好ましい。

【0020】

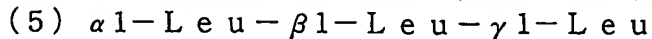
また、上記機能性ペプチドは、配列番号 3～19 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するペプチドであることが好ましい。

【0021】

また、上記機能性ペプチドは、以下の (e) 又は (f) 記載のペプチドであってもよい。(e) 配列番号 20 又は 21 に示されるアミノ酸配列を有するペプチド。(f) 配列番号 20 又は 21 に示されるアミノ酸配列において、1 個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチド。

【0022】

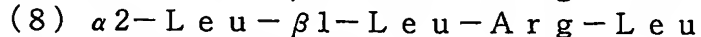
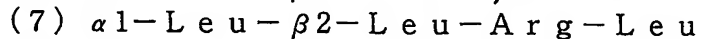
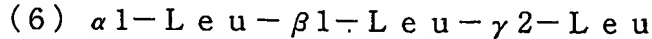
また、上記機能性ペプチドは、次に示す式 (5)



(但し、式中 $\alpha 1$ は、Asp、Asn、Glu、Gln、Thr 又は Ser を示し、 $\beta 1$ は、Asp、Gln、Asn、Arg、Glu、Thr、Ser 又は His を示し、 $\gamma 1$ は、Arg、Gln、Asn、Thr、Ser、His、Lys、又は Asp を示す。) で表されるアミノ酸配列を有するものであってもよい。

【0023】

また、上記機能性ペプチドは、次に示す式 (6)～(8)



(但し、各式中 $\alpha 1$ は、Asp、Asn、Glu、Gln、Thr 又は Ser を示し、 $\alpha 2$ は、Asn、Glu、Gln、Thr 又は Ser を示し、 $\beta 1$ は、Asp、Gln、Asn、Arg、Glu、Thr、Ser 又は His を示し、 $\beta 2$ は Asn、Arg、Thr、Ser 又は His を示し、 $\gamma 2$ は Gln、Asn、Thr、Ser、His、Lys、又は Asp を示す。)

のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するものであってもよい。

【0024】

また、上記機能性ペプチドは、配列番号 22～37、133～136 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するペプチドであってもよい。

【0025】

また、上記機能性ペプチドは、配列番号 38 又は 39 に示されるアミノ酸配列を有するペプチドであってもよい。

【0026】

また、本発明にかかる植物体は、上記生産方法により生産され、少なくとも雄ずいの形成が阻害された雄性不稔植物体であることを特徴としている。上記植物体には、成育した植物個体、植物細胞、植物組織、カルス、種子の少なくとも何れかが含まれることが好ましい。

【0027】

また、本発明にかかる植物の雄性不稔体生産キットは、上記の生産方法を行うためのキットであって、花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する転写因子をコードする遺伝子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドをコードするポリヌクレオチドと、プロモーターとを含む組換え発現ベクターを少なくとも含むことを特徴としている。上記植物の雄性不稔体生産キットは、さらに、上記組換え発現ベクターを植物細胞に導入するための試薬群を含んでもよい。

【発明の効果】

【0028】

本発明にかかる植物の雄性不稔体の生産方法では、以上のように、花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を植物体で生産させ、花器形成に関与する遺伝子の発現を抑制することによって、植物の雄性不稔体を生産する。したがって、上記キメラタンパク質をコードするキメラ遺伝子で目的の植物を形質転換すれば雄性不稔植物を生産

することができ、複雑な遺伝子組み替え技術を利用することなく、非常に簡便に目的の植物を雄性不稔化することができるという効果を奏する。

【0029】

また、本発明で用いられるキメラタンパク質は、内在性の遺伝子に対して、優性に作用するものである。そのため、植物が二倍体や複二倍体であったり、あるいは植物に機能重複遺伝子が存在したりしても、本発明にかかるキメラタンパク質は、該当する転写因子が制御する、花器形成に関わる遺伝子の発現を、一様に抑制できる。したがって、遺伝子導入可能なあらゆる植物を、雄性不稔体に容易に形質転換できるという効果を奏する。

【0030】

また、本発明で用いられる、花器形成に関わる遺伝子の転写を促進する転写因子のアミノ酸配列は、種の異なる数多くの植物間において、保存性が高いものと考えられるため、特定のモデル植物で構築したキメラタンパク質を、他の植物に導入することで、さまざまな種の植物において簡便に雄性不稔体を生産できるという効果を奏する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0031】

以下に、本発明の一実施形態について説明する。なお、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

【0032】

本発明は、植物の雄性不稔体を生産する技術であって、花器形成に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を、植物体で生産させるものである。これによって得られる植物体では、正常な花粉形成ができないため、本発明により、雄性不稔植物体を生産できる。

【0033】

ここで、正常な花粉形成ができなくなることは、次のようにして起こる。すなわち、上記キメラタンパク質における上記転写因子由来のDNA結合ドメインが、花器形成に関与すると推定される標的遺伝子に結合する。上記転写因子は転写抑制因子に転換され、標的遺伝子の転写が抑制される。これにより、例えば雄ずいの形成が阻害されるなどして、正常な花粉形成ができない雄性不稔植物体を得ることが出来る。

【0034】

本発明の生産方法で生産される植物の雄性不稔体（本雄性不稔体）は、正常な花粉形成ができないものである。すなわち、本雄性不稔体の例には、雄ずいの形成が阻害され、花粉がまったく形成されないものや、雄ずいは形成されるが、葯が形成されないために、花粉が形成されないものや、雄ずいも葯も形成されるが、形成される花粉の量が少なく、葯の開裂に至らないものや、形成された花粉が肥大化して互いにくっついてしまい、全く飛散しないもの、などがある。

【0035】

なお、本雄性不稔体では、雌ずいは稔性を有している。このため、本雄性不稔体に他種の花粉を授粉できる。したがって、雑種強勢を利用した交配により、一代雑種を得ることが出来る。

【0036】

また、本雄性不稔体では、正常な花粉形成ができなくなることに加えて、他の組織の形成が正常に行われなくなってもよい。例えば、本雄性不稔体は、花卉や萼などが通常とは異なる形に形成されるものや、あるいは全く形成されていないものでもよい。例えば、花卉や萼がまったく形成されなければ、雌ずいが露出するため、他種の花粉を授粉する際の手間（萼や花卉を除去する等）を簡略化できる。

【0037】

以降の説明では、本発明にかかる雄性不稔植物体の生産方法に用いられるキメラタンパク質、本発明にかかる植物体の生産方法の一例、これにより得られる植物体とその有用性、並びにその利用について、それぞれ説明する。

【0038】

(I) 本発明で用いられるキメラタンパク質

上述したように、本発明で用いられるキメラタンパク質は、花器形成に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたものである。

【0039】

また、本発明で用いられるキメラタンパク質は、内在性の遺伝子に対して、優性に作用するものである。すなわち、本発明にかかるキメラタンパク質は、植物が二倍体や複二倍体であったり、あるいは植物に機能重複遺伝子が存在したりしても、該当する転写因子が制御する、花器形成に関わる遺伝子の発現を、一様に抑制できる。そのため、遺伝子導入可能なあらゆる植物を、雄性不稔体に容易に形質転換できる。

【0040】

以下では、上記転写因子および機能性ペプチドそれぞれについて説明する。

【0041】

(I-1) 花器形成に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子

本発明で用いられる転写因子は、花器形成に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子であれば特に限定されるものではない。かかる転写因子は多くの植物に保存されている。したがって、本発明で用いられる転写因子には、種々の植物に保存されている同様の機能を有するタンパク質が含まれる。

【0042】

このような転写因子としては、MADS Boxを含んだ転写因子であるAPETAL3タンパク質やPISTILLATAタンパク質があるが、これらに限定されるものではない。

【0043】

本発明で用いられる転写因子の代表的な一例としては、例えば、APETAL3タンパク質を挙げることができる。APETAL3タンパク質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質であり、上述したように、花器形成に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子であることが知られている。また、シロイヌナズナでは、このAPETAL3タンパク質をコードする遺伝子（説明の便宜上、APETAL3遺伝子と称する）の変異株において、花卉と雄ずいの形成が阻害されることが知られている（Thomas Jack, Laura L. Brockman, and Elliot M. Meyerowitz., Cell, Vol 68, pp 683-697, February, 1992を参照のこと）。本発明では、例えば、このAPETAL3タンパク質に後述する機能性ペプチドを融合させることにより、転写因子であるAPETAL3タンパク質を転写抑制因子に転換させる。

【0044】

本発明で用いられる転写因子としては、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するAPETAL3タンパク質に限定されるものではなく、花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する機能を有する転写因子であればよい。具体的には、配列番号1に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であっても、上記機能を有していれば本発明にて用いることができる。なお、上記の「配列番号1に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列」における「1個又は数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1個から5個、特に好ましくは1個から3個を意味する。

【0045】

また、本発明で用いられる、花器形成に関わる遺伝子の転写を促進する転写因子のアミノ酸配列は、種の異なる数多くの植物間において、保存性が高いものと考えられる。そのため、雄性不稔体を生産したい個々の植物体において、花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する固有の転写因子やその遺伝子を、必ずしも単離する必要はない。すなわち、後

述する実施例で示す、シロイヌナズナで構築したキメラタンパク質を、他の植物に導入することで、さまざまな種の植物において簡便に雄性不稔体を生産できると考えられる。

【0046】

本発明で用いられるキメラタンパク質を生産させる際には、後述するように、公知の遺伝子組換え技術を好適に用いることができる。そこで、本発明にかかる植物体の生産方法には、上記転写因子をコードする遺伝子も好適に用いることができる。

【0047】

上記転写因子をコードする遺伝子としては特に限定されるものではないが、具体的な一例としては、例えば、転写因子として A P E T A L 3 タンパク質を用いる場合には、この A P E T A L 3 遺伝子を挙げることができる。A P E T A L 3 遺伝子の具体的な一例としては、例えば、配列番号 2 に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム (O R F) として含むポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0048】

もちろん、本発明で用いられる A P E T A L 3 遺伝子、または、転写因子をコードする遺伝子としては、上記の例に限定されるものではなく、配列番号 2 に示される塩基配列と相同性を有する遺伝子であってもよい。具体的には、例えば、配列番号 2 に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、上記転写因子をコードする遺伝子等を挙げることができる。なお、ここでストリンジェントな条件でハイブリダイズするとは、60℃で 2×SSC 洗浄条件下で結合することを意味する。

【0049】

上記ハイブリダイゼーションは、J. Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989) に記載されている方法等、従来公知の方法で行うことができる。通常、温度が高いほど、塩濃度が低いほどストリンジェンシーは高くなる (ハイブリダイズしがたくなる)。

【0050】

上記転写因子をコードする遺伝子を取得する方法は特に限定されるものではなく、従来公知の方法により、多くの植物から単離することができる。例えば、既知の転写因子の塩基配列に基づき作製したプライマー対を用いることができる。このプライマー対を用いて、植物の cDNA 又はゲノミック DNA を鋳型として PCR を行うこと等により上記遺伝子を得ることができる。また、上記転写因子をコードする遺伝子は、従来公知の方法により化学合成して得ることもできる。

【0051】

(I-2) 任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチド

本発明で用いられる、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチド (説明の便宜上、転写抑制転換ペプチドと称する) としては、特に限定されるものではなく、転写因子と融合させたキメラタンパク質を形成させることにより、当該転写因子により制御される標的遺伝子の転写を抑制することができるペプチド (特許文献 1~7、非特許文献 5・6 等参照) であればよい。このペプチドは、Class II E R F (Ethylene Responsive Element Binding Factor) タンパク質や植物のジンクフィンガータンパク質 (Zinc Finger Protein、例えばシロイヌナズナ S U P E R M A N タンパク質等) から切り出されたもので、極めて単純な構造を有している。

【0052】

上記転写抑制転換ペプチドの一例の具体的な構造は、下記式 (1) ~ (4) の何れかで表されるアミノ酸配列となっている。

(1) X 1 - L e u - A s p - L e u - X 2 - L e u - X 3

(但し、式中、X 1 は 0 ~ 10 個のアミノ酸残基を示し、X 2 は A s n 又は G l u を示し、X 3 は少なくとも 6 個のアミノ酸残基を示す。)

(2) Y 1 - P h e - A s p - L e u - A s n - Y 2 - Y 3

(但し、式中、Y 1 は 0 ~ 10 個のアミノ酸残基を示し、Y 2 は P h e または I l e を示

し、Y3は少なくとも6個のアミノ酸残基を示す。)

(3) Z1-Asp-Leu-Z2-Leu-Arg-Leu-Z3

(但し、式中、Z1はLeu、Asp-LeuまたはLeu-Asp-Leuを示し、Z2はGlu、GlnまたはAspを示し、Z3は0~10個のアミノ酸残基を示す。)

(4) Asp-Leu-Z4-Leu-Arg-Leu

(但し、式中、Z4はGlu、GlnまたはAspを示す。)

(I-2-1) 式(1)の転写抑制転換ペプチド

上記式(1)の転写抑制転換ペプチドにおいては、上記X1で表されるアミノ酸残基の数は0~10個の範囲内であればよい。また、X1で表されるアミノ酸残基を構成する具体的なアミノ酸の種類は特に限定されるものではなく、どのようなものであってもよい。換言すれば、上記式(1)の転写抑制転換ペプチドにおいては、N末端側には、1個の任意のアミノ酸または2~10個の任意のアミノ酸残基からなるオリゴマーが付加されていてもよいし、アミノ酸が何も付加されていなくてもよい。

【0053】

このX1で表されるアミノ酸残基は、式(1)の転写抑制転換ペプチドを合成するときの容易さからみれば、できるだけ短いほうがよい。具体的には、10個以下であることが好ましく、5個以下であることがより好ましい。

【0054】

同様に、上記式(1)の転写抑制転換ペプチドにおいては、上記X3で表されるアミノ酸残基の数は少なくとも6個であればよい。また、X3で表されるアミノ酸残基を構成する具体的なアミノ酸の種類は特に限定されるものではなく、どのようなものであってもよい。換言すれば、上記式(1)の転写抑制転換ペプチドにおいては、C末端側には、6個以上の任意のアミノ酸残基からなるオリゴマーが付加されていればよい。上記X3で表されるアミノ酸残基は、最低6個あれば上記機能を示すことができる。

【0055】

上記式(1)の転写抑制転換ペプチドにおいて、X1およびX3を除いた5個のアミノ酸残基からなるペプタマー(5mer)の具体的な配列は、配列番号40、41に示す。なお、上記X2がAsnの場合のアミノ酸配列が配列番号40に示すアミノ酸配列であり、上記X2がGluの場合のアミノ酸配列が配列番号41に示すアミノ酸配列である。

【0056】

(I-2-2) 式(2)の転写抑制転換ペプチド

上記式(2)の転写抑制転換ペプチドにおいては、上記式(1)の転写抑制転換ペプチドのX1と同様、上記Y1で表されるアミノ酸残基の数は0~10個の範囲内であればよい。また、Y1で表されるアミノ酸残基を構成する具体的なアミノ酸の種類は特に限定されるものではなく、どのようなものであってもよい。換言すれば、上記式(2)の転写抑制転換ペプチドにおいては、上記式(1)の転写抑制転換ペプチドと同様、N末端側には、1個の任意のアミノ酸または2~10個の任意のアミノ酸残基からなるオリゴマーが付加されていてもよいし、アミノ酸が何も付加されていなくてもよい。

【0057】

このY1で表されるアミノ酸残基は、式(2)の転写抑制転換ペプチドを合成するときの容易さからみれば、できるだけ短いほうがよい。具体的には、10個以下であることが好ましく、5個以下であることがより好ましい。

【0058】

同様に、上記式(2)の転写抑制転換ペプチドにおいては、上記式(1)の転写抑制転換ペプチドのX3と同様、上記Y3で表されるアミノ酸残基の数は少なくとも6個であればよい。また、Y3で表されるアミノ酸残基を構成する具体的なアミノ酸の種類は特に限定されるものではなく、どのようなものであってもよい。換言すれば、上記式(2)の転写抑制転換ペプチドにおいては、上記式(1)の転写抑制転換ペプチドと同様、C末端側には、6個以上の任意のアミノ酸残基からなるオリゴマーが付加されていればよい。上記Y3で表されるアミノ酸残基は、最低6個あれば上記機能を示すことができる。

【0059】

上記式(2)の転写抑制転換ペプチドにおいて、Y1およびY3を除いた5個のアミノ酸残基からなるペプタマー(5mer)の具体的な配列は、配列番号42、43に示す。なお、上記Y2がPheの場合のアミノ酸配列が配列番号42に示すアミノ酸配列であり、上記Y2がIleの場合のアミノ酸配列が配列番号43に示すアミノ酸配列である。また、Y2を除いた4個のアミノ酸残基からなるテトラマー(4mer)の具体的な配列は、配列番号44に示す。

【0060】

(I-2-3)式(3)の転写抑制転換ペプチド

上記式(3)の転写抑制転換ペプチドにおいては、上記Z1で表されるアミノ酸残基は、1~3個の範囲内でLeuを含むものとなっている。アミノ酸1個の場合は、Leuであり、アミノ酸2個の場合は、Asp-Leuとなっており、アミノ酸3個の場合はLeu-Asp-Leuとなっている。

【0061】

一方、上記式(3)の転写抑制転換ペプチドにおいては、上記式(1)の転写抑制転換ペプチドのX1等と同様、上記Z3で表されるアミノ酸残基の数は0~10個の範囲内であればよい。また、Z3で表されるアミノ酸残基を構成する具体的なアミノ酸の種類は特に限定されるものではなく、どのようなものであってもよい。換言すれば、上記式(3)の転写抑制転換ペプチドにおいては、C末端側には、1個の任意のアミノ酸または2~10個の任意のアミノ酸残基からなるオリゴマーが付加されていてもよいし、アミノ酸が何も付加されていなくてもよい。

【0062】

このZ3で表されるアミノ酸残基は、式(3)の転写抑制転換ペプチドを合成するときの容易さからみれば、できるだけ短いほうがよい。具体的には、10個以下であることが好ましく、5個以下であることがより好ましい。Z3で表されるアミノ酸残基の具体的な例としては、Gly、Gly-Phe-Phe、Gly-Phe-Ala、Gly-Tyr-Tyr、Ala-Ala-Ala等が挙げられるが、もちろんこれらに限定される物ではない。

【0063】

また、この式(3)で表される転写抑制転換ペプチド全体のアミノ酸残基の数は、特に限定されるものではないが、合成するときの容易さからみれば、20アミノ酸以下であることが好ましい。

【0064】

上記式(3)の転写抑制転換ペプチドにおいて、Z3を除いた7~10個のアミノ酸残基からなるオリゴマーの具体的な配列は、配列番号45~53に示す。なお、上記Z1がLeuかつZ2がGlu、GlnまたはAspの場合のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号45、46または47に示すアミノ酸配列であり、上記Z1がAsp-LeuかつZ2がGlu、GlnまたはAspの場合のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号48、49または50に示すアミノ酸配列であり、上記Z1がLeu-Asp-LeuかつZ2がGlu、GlnまたはAspの場合のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号51、52または53に示すアミノ酸配列である。

【0065】

(I-2-4)式(4)の転写抑制転換ペプチド

上記式(4)の転写抑制転換ペプチドは、6個のアミノ酸残基からなるヘキサマー(6mer)であり、その具体的な配列は、配列番号7、16、54に示す。なお、上記Z4がGluの場合のアミノ酸配列が配列番号7に示すアミノ酸配列であり、上記Z4がAspの場合のアミノ酸配列が配列番号16に示すアミノ酸配列であり、上記Z4がGlnの場合のアミノ酸配列が配列番号54に示すアミノ酸配列である。

【0066】

特に、本発明において用いられる転写抑制転換ペプチドは、上記式(4)で表されるへ

キサマーのような最小配列を有するペプチドであってもよい。例えば、配列番号7に示すアミノ酸配列は、シロイヌナズナSUPERMANタンパク質(SUPタンパク質)の196~201番目のアミノ酸配列に相当し、上述したように、本発明者が新たに上記転写抑制転換ペプチドとして見出したものである。

【0067】

(I-2-5) 転写抑制転換ペプチドのより具体的な例

上述した各式で表される転写抑制転換ペプチドのより具体的な例としては、例えば、配列番号3~19のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するペプチドを挙げることができる。これらオリゴペプチドは、本発明者が上記転写抑制転換ペプチドであることを見出したものである(例えば、特許文献7参照)。

【0068】

さらに、上記転写抑制転換ペプチドの他の具体的な例として、次に示す(e)又は(f)記載のオリゴペプチドを挙げることができる。

(e) 配列番号20又は21に示されるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチド。

(f) 配列番号20又は21に示されるいずれかのアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなるペプチド。

【0069】

上記配列番号20に示されるアミノ酸配列からなるペプチドは、SUPタンパク質である。また、上記の「配列番号20又は21に示されるいずれかのアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列」における「1個又は数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1個から5個、特に好ましくは1個から3個を意味する。

【0070】

上記アミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、上記ペプチドをコードする塩基配列を、当該技術分野で公知の手法によって改変することによって行うことができる。塩基配列に変異を導入するには、Kunkel法またはGapped duplex法等の公知手法又はこれに準ずる方法により行うことができ、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット(例えばMutant-KやMutant-G(何れも商品名、TAKARA社製))等を用いて、あるいはLA PCR in vitro Mutagenesisシリーズキット(商品名、TAKARA社製)を用いて変異が導入される。

【0071】

また、上記機能性ペプチドは、配列番号20に示されるアミノ酸配列の全長配列を有するペプチドに限られず、その部分配列を有するペプチドであってもよい。

【0072】

その部分配列を有するペプチドとしては、例えば、配列番号21に示されるアミノ酸配列(SUPタンパク質の175から204番目のアミノ酸配列)を有するペプチドが挙げられ、その部分配列を有するペプチドとしては、上記(3)で表されるペプチドが挙げられる。

【0073】

(I-3) 転写抑制転換ペプチドの他の例

本発明者は、さらに、上記モチーフの構造について検討した結果、新たに6つのアミノ酸からなるモチーフを見出した。このモチーフは、具体的には、次に示す一般式(5)で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである。これらのペプチドも、上記転写抑制転換ペプチドに含まれる。

(5) $\alpha 1$ -Leu- $\beta 1$ -Leu- $\gamma 1$ -Leu

但し、上記式(5)中 $\alpha 1$ は、Asp、Asn、Glu、Gln、Thr又はSerを示し、 $\beta 1$ は、Asp、Gln、Asn、Arg、Glu、Thr、Ser又はHisを示し、 $\gamma 1$ は、Arg、Gln、Asn、Thr、Ser、His、Lys、又はAspを示す。

【0074】

なお、上記一般式(5)で表されるペプチドを、便宜上、次に示す一般式(6)、(7)、(8)又は(9)で表されるアミノ酸配列を有しているペプチドに分類する。

(6) $\alpha 1$ -Leu- $\beta 1$ -Leu- $\gamma 2$ -Leu

(7) $\alpha 1$ -Leu- $\beta 2$ -Leu-Arg-Leu

(8) $\alpha 2$ -Leu- $\beta 1$ -Leu-Arg-Leu

(9) Asp-Leu- $\beta 3$ -Leu-Arg-Leu

但し、上記各式中、 $\alpha 1$ は、Asp、Asn、Glu、Gln、Thr又はSerを示し、 $\alpha 2$ は、Asn、Glu、Gln、Thr又はSerを示す。また、 $\beta 1$ は、Asp、Gln、Asn、Arg、Glu、Thr、Ser又はHisを示し、 $\beta 2$ はAsn、Arg、Thr、Ser又はHisを示し、 $\beta 3$ は、Glu、Asp又はGlnを示す。さらに、 $\gamma 2$ は、Gln、Asn、Thr、Ser、His、Lys、又はAspを示す。

【0075】

上記式(5)～(9)で表されるアミノ酸配列を有する転写抑制転換ペプチドのより具体的な例としては、配列番号22～37、133～136で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを挙げることができる。このうち、配列番号29、30、32又は34のペプチドは、一般式(6)に示されるペプチドに相当し、配列番号22、25、35、36又は37のペプチドは、一般式(7)に示されるペプチドに相当し、配列番号26、27、28、31、又は33のペプチドは、一般式(8)に示されるペプチドに相当し、配列番号23又は24のペプチドは、一般式(9)に示されるペプチドに相当する。

【0076】

また、上記一般式(5)～(9)に示されるペプチド以外にも配列番号38または39で表されるアミノ酸配列を有する転写抑制転換ペプチドを用いることもできる。

【0077】

(I-4) キメラタンパク質の生産方法

上記(I-2)および(I-3)で説明した各種転写抑制転換ペプチドは、上記(I-1)で説明した転写因子と融合してキメラタンパク質とすることにより、当該転写因子を転写抑制因子とすることができる。したがって、本発明では、上記転写抑制転換ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いて、転写因子をコードする遺伝子とのキメラ遺伝子を得れば、キメラタンパク質を生産させることができる。

【0078】

具体的には、上記転写抑制転換ペプチドをコードするポリヌクレオチド(説明の便宜上、転写抑制転換ポリヌクレオチドと称する)と上記転写因子をコードする遺伝子とを連結することによりキメラ遺伝子を構築して、植物細胞に導入する。これによりキメラタンパク質を生産させることができる。なお、キメラ遺伝子を植物細胞に導入する具体的な方法については、後述する(II)の項で詳細に説明する。

【0079】

上記転写抑制転換ポリヌクレオチドの具体的な塩基配列は特に限定されるものではなく、遺伝暗号に基づいて、上記転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列に対応する塩基配列を含んでいればよい。また、必要に応じて、上記転写抑制転換ポリヌクレオチドは、転写因子遺伝子と連結するための連結部位となる塩基配列を含んでいてもよい。さらに、上記転写抑制転換ポリヌクレオチドのアミノ酸読み枠と転写因子遺伝子の読み枠とが一致しないような場合に、これらを一致させるための付加的な塩基配列を含んでいてもよい。

【0080】

上記転写抑制転換ポリヌクレオチドの具体例としては、例えば、配列番号61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、137、139、141又は143に示される塩基配列を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。また、配列番号62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、

82、84、86、88、90、92、94、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、138、140、142、144に示されるポリヌクレオチドは、それぞれ、上記例示されたポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドである。また、上記転写抑制転換ポリヌクレオチドの他の具体例としては、例えば、配列番号95、96に示されるポリヌクレオチドを挙げることができる。これらのポリヌクレオチドは、以下の表1に示すように配列番号3～39、133～136に示されるアミノ酸配列に対応するものである。

【0081】

【表1】.

アミノ酸配列	塩基配列	アミノ酸配列	塩基配列
配列番号3	配列番号61・62	配列番号24	配列番号101・102
配列番号4	配列番号63・64	配列番号25	配列番号103・104
配列番号5	配列番号65・66	配列番号26	配列番号105・106
配列番号6	配列番号67・68	配列番号27	配列番号107・108
配列番号7	配列番号69・70	配列番号28	配列番号109・110
配列番号8	配列番号71・72	配列番号29	配列番号111・112
配列番号9	配列番号73・74	配列番号30	配列番号113・114
配列番号10	配列番号75・76	配列番号31	配列番号115・116
配列番号11	配列番号77・78	配列番号32	配列番号117・118
配列番号12	配列番号79・80	配列番号33	配列番号119・120
配列番号13	配列番号81・82	配列番号34	配列番号121・122
配列番号14	配列番号83・84	配列番号35	配列番号123・124
配列番号15	配列番号85・86	配列番号36	配列番号125・126
配列番号16	配列番号87・88	配列番号37	配列番号127・128
配列番号17	配列番号89・90	配列番号38	配列番号129・130
配列番号18	配列番号91・92	配列番号39	配列番号131・132
配列番号19	配列番号93・94	配列番号133	配列番号137・138
配列番号20	配列番号95	配列番号134	配列番号139・140
配列番号21	配列番号96	配列番号135	配列番号141・142
配列番号22	配列番号97・98	配列番号136	配列番号143・144
配列番号23	配列番号99・100		

【0082】

本発明で用いられるキメラタンパク質は、転写因子をコードする遺伝子と転写抑制転換ポリヌクレオチドとを連結した上記キメラ遺伝子から得ることができる。したがって、上記キメラタンパク質は、上記転写因子の部位と、上記転写抑制転換ペプチドの部位とが含まれていればよく、その構成は特に限定されるものではない。例えば、転写因子と転写抑制転換ペプチドとの間をつなぐためのリンカー機能を有するポリペプチドや、HisやMy c、F l a g等のようにキメラタンパク質をエピトープ標識するためのポリペプチド等、各種の付加的なポリペプチドが含まれていてもよい。さらに上記キメラタンパク質には、必要に応じて、ポリペプチド以外の構造、例えば、糖鎖やイソプレノイド基等が含まれていてもよい。

【0083】

(I I) 本発明にかかる植物体の生産方法の一例

本発明にかかる植物体の生産方法は、上記(I)で説明したキメラタンパク質を植物体で生産させ、花器形成に関与する遺伝子の発現を抑制する過程を含んでいれば特に限定されるものではないが、本発明にかかる植物体の生産方法を具体的な工程で示せば、例えば、発現ベクター構築工程、形質転換工程、選抜工程等の工程を含む生産方法として挙げることができる。このうち、本発明では、少なくとも形質転換工程が含まれていればよい。以下、各工程について具体的に説明する。

【0084】

(I I-1) 発現ベクター構築工程

本発明において行われる発現ベクター構築工程は、上記(I-1)で説明した転写因子をコードする遺伝子と、上記(I-4)で説明した転写抑制転換ポリヌクレオチドと、プロモーターとを含む組換え発現ベクターを構築する工程であれば特に限定されるものではない。

【0085】

上記組換え発現ベクターの母体となるベクターとしては、従来公知の種々のベクターを用いることができる。例えば、プラスミド、ファージ、またはコスミド等を用いることができ、導入される植物細胞や導入方法に応じて適宜選択することができる。具体的には、例えば、pBR322、pBR325、pUC19、pUC119、pBluescript、pBluescript SK、pBI系のベクター等を挙げることができる。特に、植物体へのベクターの導入法がアグロバクテリウムを用いる方法である場合には、pBI系のバイナリーベクターを用いることが好ましい。pBI系のバイナリーベクターとしては、具体的には、例えば、pBIG、pBIN19、pBI101、pBI121、pBI221等を挙げることができる。

【0086】

上記プロモーターは、植物体内で遺伝子を発現させることが可能なプロモーターであれば特に限定されるものではなく、公知のプロモーターを好適に用いることができる。かかるプロモーターとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター(CaMV35S)、アクチンプロモーター、ノパリン合成酵素のプロモーター、タバコのPR1a遺伝子プロモーター、トマトのリプロース1、5-エリトリン酸カルボキシラーゼ・オキシダーゼ小サブユニットプロモーター等を挙げることができる。この中でも、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターまたはアクチンプロモーターをより好ましく用いることができる。上記各プロモーターを用いれば、得られる組換え発現ベクターでは、植物細胞内に導入されたときに任意の遺伝子を強く発現させることが可能となる。

【0087】

上記プロモーターは、転写因子をコードする遺伝子と転写抑制転換ポリヌクレオチドとを連結したキメラ遺伝子を発現しうるように連結され、ベクター内に導入されていればよく、組換え発現ベクターとしての具体的な構造は特に限定されるものではない。

【0088】

上記組換え発現ベクターは、上記プロモーターおよび上記キメラ遺伝子に加えて、さらに他のDNAセグメントを含んでいてもよい。当該他のDNAセグメントは特に限定されるものではないが、ターミネーター、選別マーカー、エンハンサー、翻訳効率を高めるための塩基配列等を挙げることができる。また、上記組換え発現ベクターは、さらにT-DNA領域を有していてもよい。T-DNA領域は特にアグロバクテリウムを用いて上記組換え発現ベクターを植物体に導入する場合に遺伝子導入の効率を高めることができる。

【0089】

ターミネーターは転写終結部位としての機能を有していれば特に限定されるものではなく、公知のものであってもよい。例えば、具体的には、ノパリン合成酵素遺伝子の転写終結領域(Nosターミネーター)、カリフラワーモザイクウイルス35Sの転写終結領域(CaMV35Sターミネーター)等を好ましく用いることができる。この中でもNosターミネーターをより好ましく用いることができる。

【0090】

上記形質転換ベクターにおいては、ターミネーターを適当な位置に配置することにより、植物細胞に導入された後に、不必要に長い転写物を合成したり、強力なプロモーターがプラスミドのコピー数の減少させたりするような現象の発生を防止することができる。

【0091】

上記選別マーカーとしては、例えば薬剤耐性遺伝子を用いることができる。かかる薬剤耐性遺伝子の具体的な一例としては、例えば、ハイグロマイシン、ブレオマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール等に対する薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。これにより、上記抗生物質を含む培地中で生育する植物体を選択することによって、形質転換された植物体を容易に選別することができる。

【0092】

上記翻訳効率を高めるための塩基配列としては、例えばタバコモザイクウイルス由来の *omega* 配列を挙げることができる。この *omega* 配列をプロモーターの非翻訳領域 (5' UTR) に配置させることによって、上記キメラ遺伝子の翻訳効率を高めることができる。このように、上記形質転換ベクターには、その目的に応じて、さまざまな DNA セグメントを含ませることができる。

【0093】

上記組換え発現ベクターの構築方法についても特に限定されるものではなく、適宜選択された母体となるベクターに、上記プロモーター、転写因子をコードする遺伝子、および転写抑制転換ポリヌクレオチド、並びに必要に応じて上記他の DNA セグメントを所定の順序となるように導入すればよい。例えば、転写因子をコードする遺伝子と転写抑制転換ポリヌクレオチドとを連結してキメラ遺伝子を構築し、次に、このキメラ遺伝子とプロモーターと（必要に応じてターミネーター等）とを連結して発現カセットを構築し、これをベクターに導入すればよい。

【0094】

キメラ遺伝子の構築および発現カセットの構築では、例えば、各 DNA セグメントの切断部位を互いに相補的な突出末端としておき、ライゲーション酵素で反応させることで、当該 DNA セグメントの順序を規定することが可能となる。なお、発現カセットにターミネーターが含まれる場合には、上流から、プロモーター、上記キメラ遺伝子、ターミネーターの順となっていればよい。また、組換え発現ベクターを構築するための試薬類、すなわち制限酵素やライゲーション酵素等の種類についても特に限定されるものではなく、市販のものを適宜選択して用いればよい。

【0095】

また、上記組換え発現ベクターの増殖方法（生産方法）も特に限定されるものではなく、従来公知の方法を用いることができる。一般的には大腸菌を宿主として当該大腸菌内で増殖させればよい。このとき、ベクターの種類に応じて、好ましい大腸菌の種類を選択してもよい。

【0096】

(II-2) 形質転換工程

本発明において行われる形質転換工程は、上記 (II-1) で説明した組換え発現ベクターを植物細胞に導入して、上記 (I) で説明したキメラタンパク質を生産させるようになっていけばよい。

【0097】

上記組換え発現ベクターを植物細胞に導入する方法（形質転換方法）は特に限定されるものではなく、植物細胞に応じた適切な従来公知の方法を用いることができる。具体的には、例えば、アグロバクテリウムを用いる方法や直接、植物細胞に導入する方法を用いることができる。アグロバクテリウムを用いる方法としては、例えば、Transformation of *Arabidopsis thaliana* by vacuum infiltration (<http://www.bch.msu.edu/pamgreen/protocol.htm>) を用いることができる。

【0098】

組換え発現ベクターを直接植物細胞に導入する方法としては、例えば、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法（電気穿孔法）、ポリエチレングリコール法、パーティクルガン法、プロトプラスト融合法、リン酸カルシウム法等を用いることができる。

【0099】

上記組換え発現ベクターが導入される植物細胞としては、例えば、花、葉、根等の植物器官における各組織の細胞、カルス、懸濁培養細胞等を挙げることができる。

【0100】

ここで、本発明にかかる植物体の生産方法においては、上記組換え発現ベクターは、生産しようとする種類の植物体に合わせて適切なものを適宜構築してもよいが、汎用的な組換え発現ベクターを予め構築しておき、それを植物細胞に導入してもよい。すなわち、本発明にかかる植物体の生産方法においては、上記（I-1）で説明した組換え発現ベクター構築工程が含まれていてもよいし、含まれていなくてもよい。

【0101】

（II-3）その他の工程、その他の方法

本発明にかかる植物体の生産方法においては、上記形質転換工程が含まれていればよく、さらに上記組換え発現ベクター構築工程が含まれていてもよいが、さらに他の工程が含まれていてもよい。具体的には、形質転換後の植物体から適切な形質転換体を選抜する選抜工程を挙げることができる。

【0102】

選抜の方法は特に限定されるものではなく、例えば、ハイグロマイシン耐性等の薬剤耐性を基準として選抜してもよいし、形質転換体を育成した後に、成長した植物体において、正常な花粉形成ができないことを基準として選抜してもよい。

【0103】

本発明にかかる植物体の生産方法では、上記キメラ遺伝子を植物体に導入するため、該植物体から、有性生殖または無性生殖により、花器形成に関与する遺伝子の発現が抑制された子孫を得ることが可能となる。また、該植物体やその子孫から植物細胞や、種子、果実、株、カルス、塊茎、切穂、塊等の繁殖材料を得て、これらを基に該植物体を量産することも可能となる。したがって、本発明にかかる植物体の生産方法では、選抜後の植物体を繁殖させる繁殖工程（量産工程）が含まれていてもよい。

【0104】

なお、本発明における植物体とは、成育した植物個体、植物細胞、植物組織、カルス、種子の少なくとも何れかが含まれる。つまり、本発明では、最終的に植物個体まで成育させることができる状態のものであれば、全て植物体と見なす。また、上記植物細胞には、種々の形態の植物細胞が含まれる。かかる植物細胞としては、例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉の切片等が含まれる。これらの植物細胞を増殖・分化させることにより植物体を得ることができる。なお、植物細胞からの植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて、従来公知の方法を用いて行うことができる。したがって、本発明にかかる植物体の生産方法では、植物細胞から植物体を再生させる再生工程が含まれていてもよい。

【0105】

また、本発明にかかる植物体の生産方法は、組換え発現ベクターで形質転換する方法に限定されるものではなく、他の方法を用いてもよい。具体的には、例えば、上記キメラタンパク質そのものを植物体に投与してもよい。その際、キメラタンパク質の投与方法も特に限定されるものではなく、公知の各種方法を用いればよい。

【0106】

（III）本発明により得られる植物体とその有用性、並びにその利用

本発明にかかる植物体の生産方法は、上記キメラタンパク質をコードする遺伝子を植物体で発現させることによる。当該キメラタンパク質における転写因子由来のDNA結合ドメインが、花器形成に関与すると推定される標的遺伝子に結合する。転写因子は転写抑制因子に転換され、標的遺伝子の転写が抑制される。これにより、花器形成に変異が生じ、

花粉形成が正常に行われなくなる雄性不稔性の植物体を得ることができる。したがって、本発明には、上記植物体の生産方法により得られる雄性不稔植物体も含まれる。

【0107】

(III-1) 本発明にかかる植物体の具体例

本発明にかかる雄性不稔植物体の具体的な種類は特に限定されるものではなく、雄性不稔性を獲得することによりその有用性が高まる植物を挙げることができる。かかる植物は、被子植物であってもよいし裸子植物であってもよい。裸子植物としては、例えば、スギ目のスギ科、マツ科、ヒノキ科の植物やマキ科の植物を挙げることができる。また、被子植物としては、単子葉植物であってもよいし、双子葉植物であってもよい。双子葉植物としては、例えば、シロイヌナズナ等のアブラナ科、マメ科、チャ等のツバキ科等の植物を挙げることができる。また、単子葉植物としては、イネ、トウモロコシ、ムギ等のイネ科、ホシクサ科等の植物を挙げることができる。

【0108】

また、本発明にかかる雄性不稔植物体は、果実や種子を商品とする植物、花や植物体そのものを商品とする観葉植物（花卉植物）であってもよい。したがって、本発明にかかる雄性不稔植物体の具体例をさらに挙げると、ナタネ、ジャガイモ、ホウレンソウ、大豆、キャベツ、レタス、トマト、カリフラワー、さやいんげん、かぶ、めかぶ、大根、ブロッコリー、メロン、オレンジ、スイカ、ネギ、ゴボウなどの各種の食用植物、あるいはバラ、キク、あじさい、カーネーションなどの観葉植物がある。

【0109】

(III-2) 本発明の有用性

本発明は、植物体に雄性不稔性を付与することにより一定の効果がある分野に有用性がある。具体例を以下にいくつか挙げるが、本発明の有用性は、これらに限定されるものではない。

【0110】

まず、本発明の技術により、正常な花粉形成ができない雄性不稔植物体を作出でき、雑種強勢を利用した交配による品種改良に利用できる。本発明の雄性不稔植物体では、正常な花粉形成ができないため、イネ等の自殖性植物であっても、自家受粉が行われず。そのため、他種の花粉を授粉することで、種間の交配を簡便に行える。これにより、雑種強勢を利用した、優良品種の一代雑種の探索を簡便かつ効率的に行うことができる。

【0111】

また、本発明の技術は、トウモロコシ等の他殖性植物にも適用できる。他殖性植物では、現在、人力で雄しべを刈り取る作業（除雄作業）により自家受粉を回避し、他品種の花粉を授粉して品種改良を行っている。これに対し、本発明の技術で雄性不稔植物体を生産すれば、このような労力を必要としなくなるため、品種改良に必要な時間やコスト、あるいは優良品種の栽培に必要な手間を、現状に比較して大幅に低減することができる。

【0112】

また、本発明の技術は、タマネギやジャガイモなど、地下茎を商品とする植物にも応用できる。この種の植物では、受粉が起ると、地下茎の成長が著しく阻害され、商品価値が下がることが知られている。そのため、現在、受粉を回避するために除雄作業が必要となり、そのための手間やコストが非常に大きい。本発明の技術により、地下茎を商品とする植物の雄性不稔体が得られるため、除雄作業を必要とせず、受粉を回避できる。そのため、植物体を育成して商品を生産する際のコストや時間を、現状に比較して大幅に低減できる。

【0113】

本発明の技術は、果実や花を商品としない植物体にも好適に応用できる。その一例を挙げると、花粉症の予防がある。すなわち、花粉症の原因となる花粉を大量に撒き散らす植物、例えば、スギ、ヒノキ、サワラなどの樹木、カモガヤ、オオアワガエリ、ナガハグサなどのイネ科植物、ブタクサ、ヨモギ、カナムグラなどの雑草類において、本発明の技術により雄性不稔体を生産すれば、正常な花粉形成ができないため、これらの植物体から花

粉が飛散する恐れがない。そのため、これらの雄性不稔体を、自然界の野生型植物体と置き換えてやれば、花粉症の原因となる花粉の飛散が抑えられるため、花粉症を予防できる。

【0114】

また、本発明の技術により、花粉を経由するウイルスの感染が原因となる、植物の病気を予防できる。ある種の植物ウイルスは、病的植物の花粉内に存在し、雄ずいを通じて健全植物に伝染して病気を引き起こすことが知られている。本発明の技術により、正常な花粉形成ができない植物体を生産すれば、花粉を媒介するウイルス感染が行われなため、かかる植物の病気を予防できる。

【0115】

本発明の技術により、遺伝子改変植物体の自然界への望ましくない拡散を防止できる。一例を挙げると、パルプの原料であるユーカリでは、遺伝子操作により、耐塩性や耐寒性に優れ、樹木が巨大化するなどの、より優れた形質を導入された遺伝子改変植物体が創出され、野外環境下における導入形質の検証実験が行われている。しかし、このような遺伝子改変植物体を野外環境下で育てると、風や昆虫等を媒体とした花粉の拡散を通じて、遺伝子改変植物体が自然界へ広く拡散していき、自然環境が改変される恐れがある。そのため、かかる問題に対処するために、遺伝子改変植物の検証実験を、外界から完全に隔離された、特殊な環境下で行う必要がある。

【0116】

しかし、本発明の技術を用いて、遺伝子改変植物体を、正常な花粉形成ができない雄性不稔体に形質転換させておけば、花粉の撒布による遺伝子改変植物体の自然界への拡散は起こらない。そのため、現状に比較して、実際の野外環境下により近い条件で、遺伝子改変植物体の検証試験を行うことができる。これにより、遺伝子改変植物体に導入した形質を、より自然な環境下で検証できる。

【0117】

また、本発明の技術を用いれば、萼や雄ずいなど、花器の一部が欠損したり、あるいは変形したりした植物体を生産することができる。これにより、従来には存在しなかった特異な形状の花器を有する植物体を生産できるため、これまでにない、新たな観賞植物を得ることが出来る。

【0118】

(III-3) 本発明の利用の一例

本発明の利用分野、利用方法は特に限定されるものではないが、一例として、本発明にかかる植物体の生産方法を行うためのキット、すなわち植物の雄性不稔体化キットを挙げることができる。

【0119】

この雄性不稔体化キットの具体例としては、上記転写因子をコードする遺伝子と上記転写抑制転換ポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを少なくとも含んでいればよく、上記組換え発現ベクターを植物細胞に導入するための試薬群を含んでいればより好ましい。上記試薬群としては、形質転換の種類に応じた酵素やバッファ等を挙げることができる。その他、必要に応じてマイクロ遠心チューブ等の実験用素材を添付してもよい。

【0120】

本発明は上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

【実施例】

【0121】

以下、本発明を実施例及び図1に基づいてより具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0122】

以下の実施例においては、転写抑制転換ペプチドのひとつである12アミノ酸ペプチドLDLDLELRGFA (SRDX) (配列番号19) をコードするポリヌクレオチドを、APETAL3遺伝子と結合し、さらに植物細胞で機能するカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流につないで、組換え発現ベクターを構築し、これをシロイヌナズナにアグロバクテリウム法を用いて導入することにより、シロイヌナズナを形質転換した。

【0123】

(1) 植物形質転換用ベクターpBIG2の構築

クローンテック社製 (Clontech 社、USA) のプラスミドp35S-GFPを制限酵素HindIIIとBamHIで切断し、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターを含むDNA断片をアガロースゲル電気泳動で分離し回収した。

【0124】

米国ミシガン州立大学より譲渡された植物形質転換用ベクターpBIG-HYG (Becker, D. 1990 Nucleic Acid Research, 18:203) を制限酵素HindIIIとSstIとで切断し、アガロースゲル電気泳動によってGUS遺伝子を除いたDNA断片を得た。

【0125】

以下の配列を有するDNAを合成し、70℃で10分、加温した後、自然冷却によりアニールさせて2本鎖DNAとした。このDNA断片は、5'末端から、BamHI制限酵素部位、翻訳効率を高めるタバコモザイクウイルス由来のomega配列、制限酵素部位SmaI、および制限酵素部位SalIとSstIとをこの順に有する。

5'-GATCCACAATTACCAACAACAACAACAACAACATTACAATTACAGATCCCGGGGTACCGTCGACGAGCT-3' (配列番号59)

5'-CGTCGACGGTACCCCGGATCTGTAATTGTAATGTTGTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTAATTGTG- (配列番号60)

次に、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター領域を含むDNA断片と、合成した2本鎖DNAとを、GUS遺伝子を除いたpBIG-HYGのHindIII、SstI部位に挿入し、植物形質転換用ベクターpBIG2を得た。

【0126】

(2) 組換え発現ベクターpAPETAL3SRDXの構築

<APETAL3 cDNAの単離>

シロイヌナズナcDNAライブラリーより、以下のプライマーを用いて終止コドンを除くAPETAL3のコード領域のみを含むDNA断片をPCRを用いて増幅し、アガロースゲル電気泳動により分離し回収した。PCRの条件は、変性反応94℃1分、アニール反応47℃2分、伸長反応74℃1分を1サイクルとして25サイクル行った。

5' プライマー

5' - GATGGCGAGAGGGAAGATCCAGATCAAG - 3' (配列番号57)

3' プライマー

5' - TTCAAGAAGATGGAAGGTAATGATG - 3' (配列番号58)

APETAL3遺伝子のcDNAおよびコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号2および1に示す。

【0127】

<転写抑制転換ペプチドLDLDLELRGFA (SRDX) をコードするポリヌクレオチドの合成>

12アミノ酸ペプチドLDLDLELRGFA (SRDX) をコードし、3'末端に終止コドンTAAを持つように設計した、以下の配列を有するDNAをそれぞれ合成し、70℃で10分、加温した後、自然冷却によりアニールさせて2本鎖DNAとした。

5' -CTGGATCTGGATCTAGAACTCCGTTTGGGTTTCGCTTAAG-3' (配列番号55)

5' -CTTAAGCGAAACCCAAACGGAGTTCTAGATCCAGATCCAG-3' (配列番号56)

<組換え発現ベクターの構築>

上記で得たAPETAL3遺伝子のタンパク質コード領域のみを含むDNA断片と転写抑制転換ペプチドSRDXのコード領域を含むDNA断片とを、制限酵素SmaIで切断

した上記pBIG2に挿入し、順方向にクローニングされているものを単離し、組換え発現ベクターであるプラスミドp35S::APETAL3SRDXを得た。

【0128】

(3) 組換え発現ベクターp35S::APETAL3SRDXにより形質転換した植物体の作成

p35S::APETAL3SRDXによるシロイヌナズナの形質転換は、Transformation of Arabidopsis thaliana by vacuum infiltration(<http://www.bch.msu.edu/pamgreen/protocol.htm>)に従った。ただし、感染させるのにバキュームは用いないで、浸すだけにした。p35S::APETAL3SRDXを、土壌細菌Agrobacterium tumefaciens strain GV3101 (C58C1Rifr) pMP90 (Gmr)(koncz and Schell 1986)株にエレクトロポレーション法で導入した。導入した菌を1リットルの、抗生物質(カナマイシン(Km) 50 μ g/ml、ゲンタマイシン(Gm) 25 μ g/ml、リファンピシリン(Rif) 50 μ g/ml)を含むYEP培地でOD600が1になるまで培養した。次いで、培養液から菌体を回収し、1リットルの感染用培地(Infiltration medium、下表2)に懸濁した。

【0129】

【表2】

Infiltration medium (1 l)	
2.29g	MS salt
50g	スクロース
0.5g	MES to pH5.7 with KOH
0.044 μ M	benzylaminopurine
0.2ml	Silwet L-77

【0130】

この溶液に、14日間生育したシロイヌナズナを1分間浸し、感染させた後、再び生育させて結種させた。回収した種子を50%ブリーチ、0.02%Triton X-100溶液で7分間滅菌した後、滅菌水で3回リンスし、滅菌したハイグロマイシン選択培地(下表3)に蒔種した。

【0131】

【表3】

ハイグロマイシン選択培地	
4.3g/l	MS salt
1%	スクロース
0.5g/l	MES to pH 5.7 with KOH
0.8%	Phytagar
30g/ml	ハイグロマイシン
500ml	バンコマイシン

【0132】

上記ハイグロマイシンプレートで生育する形質転換植物体を選抜し、成長させた。このようにして、p35S::APETAL3SRDXで形質転換された、成長した植物体を15ライン取得した。植物体の一例を図1に示す。

【0133】

図1(a)に示すように、p35S::APETAL3SRDXで形質転換された植物体では、全ての花器において、花弁と雄ずいが形成されていないかった。その一方で、雌ずいは正常に形成されていた。

【0134】

また、図1 (b) に示す、植物体の拡大図からわかるように、花器では、雌しべの柱頭が露出し、花弁と雄ずいが欠損していた。さらに、図1 (c) に示す花器の拡大図からわかるように、花弁および雄ずいが明白に欠損していた。このような花器の正常でない形状は、APETAL3 遺伝子の変異株における花器の形状と、同一なものであった。なお、以上の結果は、得られた15ラインの形質転換植物体の全てにおいて、同様なものであった。

【0135】

このように、p35S::APETAL3SRDXで形質転換された植物体は、萼および雄ずいが欠損した、正常な花粉形成が行われない変異体であった。なお、この植物体の雌しべに、野生型の植物体の花粉を授粉すると、種子が形成された。このことから、p35S::APETAL3SRDXで形質転換された植物体は、雌ずいが稔性を有した雄性不稔体であることが確認できた。

【産業上の利用可能性】

【0136】

本発明によれば、正常な花粉形成が行われないが、雌ずいは稔性を有している、いわゆる雄性不稔植物体を、広範囲の植物で生産できる。それゆえ、本発明は、各種農業や林業、アグリビジネス、さらには農産物を加工する産業や食品産業等に利用可能であり、しかも非常に有用であると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0137】

【図1】 実施例で組換え発現ベクター p35S::APETAL3SRDXにより形質転換されたシロイヌナズナの成長した植物体を示す図であり、(a) は植物体の全体を示す図、(b) は植物体の先端を拡大した図、(c) は花器を拡大した図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

National Institute of Advanced Industrial Science

<120> Producing process of plants with male sterility, plants produced by the process, and use thereof

<130>

<160> 144

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 232

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

```

Met Ala Arg Gly Lys Ile Gln Ile Lys Arg Ile Glu Asn Gln Thr Asn
  1           5           10           15
Arg Gln Val Thr Tyr Ser Lys Arg Arg Asn Gly Leu Phe Lys Lys Ala
      20           25           30
His Glu Leu Thr Val Leu Cys Asp Ala Arg Val Ser Ile Ile Met Phe
      35           40           45
Ser Ser Ser Asn Lys Leu His Glu Tyr Ile Ser Pro Asn Thr Thr Thr
      50           55           60
Lys Glu Ile Val Asp Leu Tyr Gln Thr Ile Ser Asp Val Asp Val Trp
      65           70           75           80
Ala Thr Gln Tyr Glu Arg Met Gln Glu Thr Lys Arg Lys Leu Leu Glu
      85           90           95
Thr Asn Arg Asn Leu Arg Thr Gln Ile Lys Gln Arg Leu Gly Glu Cys
      100          105          110
Leu Asp Glu Leu Asp Ile Gln Glu Leu Arg Arg Leu Glu Asp Glu Met
      115          120          125
Glu Asn Thr Phe Lys Leu Val Arg Glu Arg Lys Phe Lys Ser Leu Gly
      130          135          140
Asn Gln Ile Glu Thr Thr Lys Lys Lys Asn Lys Ser Gln Gln Asp Ile
      145          150          155          160
Gln Lys Asn Leu Ile His Glu Leu Glu Leu Arg Ala Glu Asp Pro His
      165          170          175
Tyr Gly Leu Val Asp Asn Gly Gly Asp Tyr Asp Ser Val Leu Gly Tyr
      180          185          190
Gln Ile Glu Gly Ser Arg Ala Tyr Ala Leu Arg Phe His Gln Asn His
      195          200          205
His His Tyr Tyr Pro Asn His Gly Leu His Ala Pro Ser Ala Ser Asp
      210          215          220
Ile Ile Thr Phe His Leu Leu Glu

```

225

230

<210> 2

<211> 699

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

```

atggcgagag ggaagatcca gatcaagagg atagagaacc agacaaacag acaagtgacg 60
tattcaaaga gaagaaatgg tttattcaag aaagcacatg agctcacggt tttgtgtgat 120
gctagggttt cgattatcat gttctctagc tccaacaagc ttcattgagta tatcagccct 180
aacaccacaa cgaaggagat cgtagatctg taccaaacta tttctgatgt cgatgtttgg 240
gccactcaat atgagcgaat gcaagaaacc aagaggaaac tgttggagac aaatagaaat 300
ctccggactc agatcaagca gaggctaggt gagtgtttgg acgagcttga cattcaggag 360
ctgcgtcgtc ttgaggatga aatggaaaac actttcaaac tcgttcgcga gcgcaagttc 420
aaatctcttg ggaatcagat cgagaccacc aagaaaaaga acaaaagtca acaagacata 480
caaaagaatc tcatacatga gctggaacta agagctgaag atcctcacta tggactagta 540
gacaatggag gagattacga ctacgttctt ggataccaaa tcgaagggtc acgtgcttac 600
gctcttcgtt tccaccagaa ccatcaccac tattaccca accatggcct tcatgcaccc 660
tctgcctctg acatcattac cttccatctt cttgaataa 699

```

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 3

```

Asp Leu Asp Leu Asn Leu Ala Pro Pro Met Glu Phe
  1             5             10

```

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 4

```

Leu Asp Leu Asn Leu Ala Pro Pro Met Glu Phe
  1             5             10

```

<210> 5

<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 5
Leu Asp Leu Asn Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 6
Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu Gly Phe Ala
1 5 10

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 7
Asp Leu Glu Leu Arg Leu
1 5

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 8

Leu Asp Leu Gln Leu Arg Leu Gly Tyr Tyr
1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 9

Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu
1 5

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 10

Leu Asp Leu Glu Leu Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 11

Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 12

Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu Gly
1 5

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 13

Phe Asp Leu Asn Phe Ala Pro Leu Asp Cys Val
1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 14

Phe Asp Leu Asn Ile Pro Pro Ile Pro Glu Phe
1 5 10

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 15

Phe Gln Phe Asp Leu Asn Phe Pro Pro Leu Asp Cys Val

1

5

10

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 16

Asp Leu Asp Leu Arg Leu

1

5

<210> 17

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 17

Val Gly Pro Thr Val Ser Asp Ser Ser Ser Ala Val Glu Glu Asn Gln

1

5

10

15

Tyr Asp Gly Lys Arg Gly Ile Asp Leu Asp Leu Asn Leu Ala Pro Pro

20

25

30

Met Glu Phe

35

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 18

Asp Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu Gly Phe Ala

1

5

10

<210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Artificially
 Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 19
 Leu Asp Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu Gly Phe Ala
 1 5 10

<210> 20
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 20
 Met Glu Arg Ser Asn Ser Ile Glu Leu Arg Asn Ser Phe Tyr Gly Arg
 1 5 10 15

Ala Arg Thr Ser Pro Trp Ser Tyr Gly Asp Tyr Asp Asn Cys Gln Gln
 20 25 30

Asp His Asp Tyr Leu Leu Gly Phe Ser Trp Pro Pro Arg Ser Tyr Thr
 35 40 45

Cys Ser Phe Cys Lys Arg Glu Phe Arg Ser Ala Gln Ala Leu Gly Gly
 50 55 60

His Met Asn Val His Arg Arg Asp Arg Ala Arg Leu Arg Leu Gln Gln
 65 70 75 80

Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Pro Ser Pro Pro Tyr Pro Asn Pro Asn
 85 90 95

Tyr Ser Tyr Ser Thr Met Ala Asn Ser Pro Pro Pro His His Ser Pro
 100 105 110

Leu Thr Leu Phe Pro Thr Leu Ser Pro Pro Ser Ser Pro Arg Tyr Arg
 115 120 125

Ala Gly Leu Ile Arg Ser Leu Ser Pro Lys Ser Lys His Thr Pro Glu
 130 135 140

Asn Ala Cys Lys Thr Lys Lys Ser Ser Leu Leu Val Glu Ala Gly Glu
 145 150 155 160

Ala Thr Arg Phe Thr Ser Lys Asp Ala Cys Lys Ile Leu Arg Asn Asp
165 170 175

Glu Ile Ile Ser Leu Glu Leu Glu Ile Gly Leu Ile Asn Glu Ser Glu
180 185 190

Gln Asp Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu Gly Phe Ala
195 200

<210> 21
<211> 30
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 21
Asn Asp Glu Ile Ile Ser Leu Glu Leu Glu Ile Gly Leu Ile Asn Glu
1 5 10 15

Ser Glu Gln Asp Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu Gly Phe Ala
20 25 30

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 22
Asp Leu Asn Leu Arg Leu
1 5

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 23
Asp Leu Asp Leu Arg Leu
1 5

<210> 24
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 24
Asp Leu Gln Leu Arg Leu
1 5

<210> 25
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 25
Asp Leu Arg Leu Arg Leu
1 5

<210> 26
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 26
Glu Leu Glu Leu Arg Leu
1 5

<210> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 27

Asn Leu Glu Leu Arg Leu
1 5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 28

Gln Leu Glu Leu Arg Leu
1 5

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 29

Asp Leu Glu Leu Asn Leu
1 5

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 30

Asp Leu Glu Leu Gln Leu
1 5

<210> 31
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 31
Thr Leu Glu Leu Arg Leu
1 5

<210> 32
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 32
Asp Leu Glu Leu Thr Leu
1 5

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 33
Ser Leu Glu Leu Arg Leu
1 5

<210> 34
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 34
Asp Leu Glu Leu Ser Leu
1 5

<210> 35
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 35
Asp Leu Thr Leu Arg Leu
1 5

<210> 36
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 36
Asp Leu Ser Leu Arg Leu
1 5

<210> 37
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 37
Asp Leu His Leu Arg Leu
1 5

<210> 38
<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 38

Asp Leu Glu Phe Arg Leu
1 5

<210> 39

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 39

Asp Phe Glu Leu Arg Leu
1 5

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 40

Leu Asp Leu Asn Leu
1 5

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 41

Leu Asp Leu Glu Leu
1 5

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 42
Phe Asp Leu Asn Phe
1 5

<210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 43
Phe Asp Leu Asn Ile
1 5

<210> 44
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 44
Phe Asp Leu Asn
1

<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 45

Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu
1 5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 46

Leu Asp Leu Gln Leu Arg Leu
1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 47

Leu Asp Leu Asp Leu Arg Leu
1 5

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 48

Asp Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu
1 5

<210> 49
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 49
Asp Leu Asp Leu Gln Leu Arg Leu
1 5

<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 50
Asp Leu Asp Leu Asp Leu Arg Leu
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 51
Leu Asp Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 52

Leu Asp Leu Asp Leu Gln Leu Arg Leu . . .
1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 53

Leu Asp Leu Asp Leu Asp Leu Arg Leu
1 5

<210> 54

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Amino Acid Sequence

<400> 54

Asp Leu Gln Leu Arg Leu
1 5

<210> 55

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 55

ctggatctgg atctagaact ccgtttgggt ttcgcttaag

40

<210> 56

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 56

cttaagcgaa acccaaacgg agttctagat ccagatccag

40

<210> 57

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 57

gatggcgaga gggaagatcc agatcaag

28

<210> 58

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 58

ttcaagaaga tggaaggtaa tgatg

25

<210> 59

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 59

gatccacaat taccaacaac aacaacaac aaacaacatt acaattacag atcccggggg 60
taccgtcgac gagct 75

<210> 60

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 60

cgtcgacggt acccccgga tctgtaattg taatgttggt tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 60
aattgtg 67

<210> 61

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 61

gatcttgatc ttaaccttgc tccacctatg gaattt 36

<210> 62

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 62

aaattccata ggtggagcaa ggtaagatc aagatc 36

<210> 63

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 63

cttgatctta accttgctcc acctatggaa ttt 33

<210> 64
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 64
aaattccata ggtggagcaa ggtaagatc aag 33

<210> 65
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 65
cttgatctta accttgctgc tgctgctgct gct 33

<210> 66
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 66
agcagcagca gcagcagcaa ggtaagatc aag 33

<210> 67
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 67

ctggatctag aactccgttt gggtttcgct

30

<210> 68

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 68

agcgaaaccc aaacggagtt ctagatccag

30

<210> 69

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 69

gatctagaac tccgtttg

18

<210> 70

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 70

caaacggagt tctagatc

18

<210> 71

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 71
ctggatctac aactccgttt gggttattac 30

<210> 72
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 72
gtaataaccc aaacggagtt gtagatccag 30

<210> 73
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 73
ctggatctag aactccgttt g 21

<210> 74
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 74
caaacggagt tctagatcca g 21

<210> 75
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 75

ctggatctag aactcgctgc cgcagcggct gca

33

<210> 76

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 76

tgcagccgct gcggcagcga gttctagatc cag

33

<210> 77

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 77

ctggatctag aactccgttt ggctgccgca

30

<210> 78

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 78

tgcggcagcc aaacggagtt ctagatccag

30

<210> 79

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 79

ctggatctag aactccgttt gggt

24

<210> 80

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 80.

acccaaacgg agttctagat ccag

24

<210> 81

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 81

ttcgatctta attttgcacc gttggattgt gtt

33

<210> 82

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 82

aacacaatcc aacggtgcaa aattaagatc gaa

33

<210> 83

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 83

tttgacctca acatccctcc gatccctgaa ttc

33

<210> 84

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 84

gaattcaggg atcggaggga tggtgaggtc aaa

33

<210> 85

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 85

tttcaattcg atcttaattt tccaccgttg gattgtgtt

39

<210> 86

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 86

aacacaatcc aacggtggaa aattaagatc gaattgaaa

39

<210> 87
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 87
gatctagatc tccgtttg 18

<210> 88
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 88
caaacggaga tctagatc 18

<210> 89
<211> 105
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 89
gtgggtccta ctgtgtcgga ctcgtcctct gcagtggaag agaaccaata tgatgggaaa 60
agaggaattg atcttgatct taaccttgct ccacctatgg aattt 105

<210> 90
<211> 105
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 90

aaattccata ggtggagcaa ggttaagatc aagatcaatt cctcttttcc catcatattg 60
gttctcttcc actgcagagg acgagtccga cacagtagga cccac 105

<210> 91
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 91
gatctggatc tagaactccg tttgggtttc gct 33

<210> 92
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 92
agcgaaaccc aaacggagtt ctagatccag atc 33

<210> 93
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 93
cttgatctgg atctagaact ccgtttgggt ttcgct 36

<210> 94
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized DNA Sequence

<400> 94

agcgaaaccc aaacggagtt ctagatccag atcaag

36

<210> 95

<211> 615

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 95

atggagagat caaacagcat agagttgagg aacagcttct atggccgtgc aagaacttca 60
ccatggagct atggagatta tgataattgc caacaggatc atgattatct tctagggttt 120
tcatggccac caagatccta cacttgacgc ttctgcaaaa gggaattcag atcggctcaa 180
gcacttggtg gccacatgaa tgttcacaga agagacagag caagactcag attacaacag 240
tctccatcat catcttcaac accttctcct ccttacccta accctaatta ctcttactca 300
accatggcaa actctcctcc tctcatcat tctcctctaa ccctatttcc aaccctttct 360
cctccatcct caccaagata tagggcaggt ttgatccgtt ccttgagccc caagtcaaaa 420
catacaccag aaaacgcttg taagactaag aaatcatctc ttttagtgga ggctggagag 480
gctacaaggt tcaccagtaa agatgcttgc aagatcctga ggaatgatga aatcatcagc 540
ttggagcttg agattgggtt gattaacgaa tcagagcaag atctggatct agaactccgt 600
ttgggtttcg cttaa 615

<210> 96

<211> 93

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 96

aatgatgaaa tcatcagctt ggagcttgag attggtttga ttaacgaatc agagcaagat 60
ctggatctag aactccgttt gggtttcgct taa 93

<210> 97

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 97

gatctaaacc tccgtctg

18

<210> 98

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 98

cagacggagg tttagatc

18

<210> 99

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 99

gatctagacc tccgtctg

18

<210> 100

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 100

cagacggagg tctagatc

18

<210> 101

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 101

gatctacagc tccgtctg

18

<210> 102
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 102
cagacggagc tgtagatc 18

<210> 103
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 103
gatctacgac tccgtttg 18

<210> 104
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 104
caaacggagt cgtagatc 18

<210> 105
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 105
gagctagaac tccgtttg 18

<210> 106
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 106
caaacggagt tctagctc 18

<210> 107
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 107
aacctagaac tccgtttg 18

<210> 108
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 108
caaacggagt tctaggtt 18

<210> 109
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 109
cagctagaac tccgtttg 18

<210> 110
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 110
caaacggagt tctagctg 18

<210> 111
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 111
gatctagaac tcaacttg 18

<210> 112
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 112
caagttgagt tctagatc 18

<210> 113
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized DNA Sequence

<400> 113
gatctagaac tccagttg 18

<210> 114
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 114
caactggagt tctagatc 18

<210> 115
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 115
acgcttgaat taagactc 18

<210> 116
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 116
gagtccttaat tcaagcgt 18

<210> 117
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 117

gatcttgaat taacgctc

18

<210> 118

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 118

gagcgttaat tcaagatc

18

<210> 119

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 119

agccttgaat taagactc

18

<210> 120

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 120

gagtcttaat tcaaggct

18

<210> 121

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 121

gatcttgaat taagcctc

18

<210> 122

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 122

gaggcttaat tcaagatc

18

<210> 123

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 123

gatcttacct taagactc

18

<210> 124

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 124

gagtcttaag gtaagatc

18

<210> 125

<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 125
gatcttagct taagactc 18

<210> 126
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 126
gagtcttaag ctaagatc 18

<210> 127
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 127
gatcttcact taagactc 18

<210> 128
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 128
gagtcttaag tgaagatc 18

<210> 129
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 129
gatctcgaat ttcgtctc 18

<210> 130
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 130
gagacgaaat tcgagatc 18

<210> 131
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 131
gatttcgaac tacgtctc 18

<210> 132
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized DNA Sequence

<400> 132

gagacgtagt tcgaaatc

18

<210> 133

<211> 6

<212> PRT

<400> 133

Ser Leu Asp Leu His Leu

1

5

<210> 134

<211> 6

<212> PRT

<400> 134

Asp Leu Thr Leu Lys Leu

1

5

<210> 135

<211> 6

<212> PRT

<400> 135

Asp Leu Ser Leu Lys Leu

1

5

<210> 136

<211> 6

<212> PRT

<400> 136

Asp Leu Ser Leu Asp Leu

1

5

<210> 137

<211> 18

<212> DNA

<400> 137

tcgcttgatc tacacctg

18

<210> 138

<211> 18

<212> DNA

<400> 138
caggtgtaga tcaagcga

18

<210> 139
<211> 18
<212> DNA

<400> 139
gatcttacgc taaagctg

18

<210> 140
<211> 18
<212> DNA

<400> 140
cagctttagc gtaagatc

18

<210> 141
<211> 18
<212> DNA

<400> 141
gatcttagcc taaagctg

18

<210> 142
<211> 18
<212> DNA

<400> 142
cagctttagg ctaagatc

18

<210> 143
<211> 18
<212> DNA

<400> 143
gatcttagcc taagcctg

18

<210> 144
<211> 18
<212> DNA

<400> 144
caggcttagg ctaagatc

18

【書類名】図面
【図1】

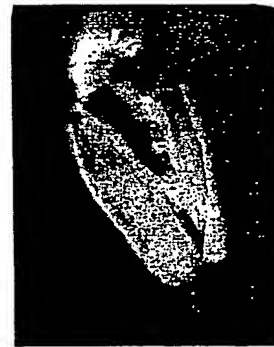
(a)



(b)



(c)



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 花器形成に関与する遺伝子の転写を抑制することにより、植物の雄性不稔体を生産する技術を提供する。

【解決手段】 花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する転写因子をコードする遺伝子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドをコードするポリヌクレオチドとのキメラ遺伝子を植物細胞に導入して、上記転写因子と上記機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を植物細胞内で生産させる。該キメラタンパク質が花器形成に関与する遺伝子の発現を優性に抑制する結果、正常な花粉形成ができない、植物の雄性不稔体が生産される。

【選択図】 なし

特願 2004-002192

出願人履歴情報

識別番号 [503360115]

1. 変更年月日 2003年10月 1日
[変更理由] 新規登録
住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名 独立行政法人 科学技術振興機構
2. 変更年月日 2004年 4月 1日
[変更理由] 名称変更
住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名 独立行政法人科学技術振興機構

特願 2004-002192

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [301021533]

1. 変更年月日 2001年 4月 2日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区霞が関1-3-1

氏 名 独立行政法人産業技術総合研究所

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/000155

International filing date: 07 January 2005 (07.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-002192
Filing date: 07 January 2004 (07.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse